

# Толл-подобные рецепторы — возможная молекулярная мишень для биологической терапии псориаза

О.Р. Катунина, А.В. Резайкина

## TLR — possible molecular target for biologic psoriasis therapy

O.R. KATUNINA, A.V. REZAYKINA

об авторах:

О.Р. Катунина — к.м.н., доц., зав. лабораторией патоморфологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

А.В. Резайкина — д.м.н., проф., в.н.с. отделения клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

**Цель:** изучение экспрессии толл-подобных рецепторов 2, 4, 9-го типов в пораженной коже больных псориазом с оценкой морфометрических параметров.

**Материал и методы.** У 15 больных псориазом (7 женщин и 8 мужчин) в возрасте от 19 до 68 лет и у 10 здоровых испытуемых контрольной группы проведены иммуногистохимические исследования кожи.

**Результаты.** Установлено повышение экспрессии толл-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 в коже больных псориазом.

**Выводы.** Этот факт существенно расширяет представления о патогенезе псориаза и определяют новый вектор исследований, направленных на поиск этиологического фактора и оптимизацию существующих методов системной терапии псориаза.

**Ключевые слова:** псориаз, иммуногистохимическое исследование, TLR2, TLR4.

**Target:** studies of 2, 4, 9 types of TLR in the affected skin of patients with psoriasis with evaluation of morphometric indices.

**Material and methods.** Immunohistochemical skin research at 15 patients, suffering from psoriasis (12 women and 18 men) in the age of 19—68 y.o. and at 10 healthy trial subjects.

**Results.** The increased expression of TLR2 и TLR4 was revealed in the skin patients, suffering from psoriasis.

**Opinions.** This fact enlarges considerably psoriasis pathogenesis perceptions and determines the new vector of research, forwarded to the search of the ethologic factor, as well as the optimization of existing methods of the systemic psoriasis therapy.

**Key words:** psoriasis, immunohistochemical research, TLR2, TLR4.

■ Работа выполнена в рамках гранта «Выявление новых молекулярных мишеней для антицитокиновой терапии иммунозависимых заболеваний кожи» (Государственный контракт от 12 июля 2011 г. № 16.512.11.2247), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы».

Псориаз — эритематозно-сквамозный дерматоз мультифакторного генеза, характеризующийся гипер-

пролиферацией эпидермальных клеток, нарушением кератинизации и выраженной воспалительной реакцией в дерме, изменениями в различных органах и системах [1].

В настоящее время общепризнанным положением является то, что возникновение воспаления в коже у больных псориазом начинается с активации клеток кожи. Роль активированных клеток кожи заключается не только в инициации «доиммунного» воспалитель-

ного процесса в ответ на проникновение неизвестного антигена, но и в привлечении клеток иммунной системы. Иммунная система вовлекается в развитие воспалительного процесса намного позже (через 2—3 недели), после внедрения через кожу неизвестного патогена. За это время патогены (микроорганизмы, вирусы и т. д.) не «путешествуют» свободно по организму, так как их распознают как «чужое» структуры кератиноцитов [2]. В середине 90-х годов XX века С. Janeway определил это «чужое» как патоген-ассоциированные молекулярные структуры (pathogen associated molecular patterns (PAMPs)), отсутствующие у многоклеточных организмов [4].

Распознавание PAMPs осуществляется с помощью так называемых толл-подобных рецепторов (toll-like receptors (TLRs)) [5], присутствующих на поверхности кератиноцитов. Кроме кератиноцитов полным спектром TLRs обладают такие клетки дермы, как макрофаги. Стимуляция TLRs способствует образованию временной сигнальной многокомпонентной структуры, побуждающей геном клетки к выработке цитокинов, молекул адгезии и костимулирующих молекул, регулирующих активацию адаптивного иммунитета [3, 4].

В том случае когда активированные клетки кожи не могут самостоятельно уничтожить патоген и обеспечить прерывание «доиммунного» воспаления, в процесс включаются клетки иммунной системы. Дендритные антигенпрезентирующие клетки (АПК) связывают антиген, обрабатывают его, подготавливая к презентации Т-клеткам, и доставляют в регионарный лимфатический узел [6]. Одной из разновидностей АПК являются белые отростчатые эпидермоциты, или клетки Лангерганса, относящиеся к типу незрелых дендритных клеток (immature dendritic cells).

Таким образом, исследование экспрессии TLRs клетками кожи имеет важное значение для углубленного понимания механизма развития иммунного воспаления в коже у больных псориазом.

**Целью работы** явилось изучение экспрессии толл-подобных рецепторов 2, 4, 9 (TLR2, TLR4, TLR9) в пораженной коже больных псориазом с оценкой морфометрических параметров.

## Материал и методы

У 15 больных псориазом (7 женщин и 8 мужчин) в возрасте от 19 до 68 лет проведены иммуногистохимические исследования кожи. У больных наблюдался псориаз среднетяжелой и тяжелой степени (индекс PASI >10) с короткими периодами ремиссии, отмечались неудовлетворительные результаты от проводимой ранее терапии.

Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев, не имевших клинических признаков заболеваний кожи.

Биоптаты брали из центра очагов поражения под местной анестезией 2% раствором лидокаина, подвергали стандартной гистологической обработке, пропитывали парафином, заливали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 5 мкм, растягивали их на предметных стеклах. Для иммуногистохимических исследований использовали предметные стекла с полилизинным покрытием Vision bio-systems plus slides (Великобритания).

Изучение количества и распределения в структурах кожи толл-подобных рецепторов 2, 4 и 9-го классов (TLR2, TLR4 и TLR9) проводили непрямым иммунопероксидазным иммуногистохимическим методом. Использовали кроличьи поликлональные антитела против TLR2, TLR4, TLR9 человека производства фирмы Abbotec (США). Визуализация реакции осуществлялась DAB-хромогеном. Постановку иммуногистохимической реакции осуществляли согласно протоколам, прилагаемым к используемым антителам. Полученные гистологические и иммуногистохимические препараты заключали под покровное стекло и изучали с помощью светового микроскопа Leica DM4000B (Германия).

Морфометрический анализ проводили с применением компьютерной программы анализа изображения ImageJ. Для этого в каждом срезе цифровой фотокамерой с высоким разрешением Leica DFC320 (Германия) фотографировали по 5 полей зрения в эпидермисе на отрезке длиной 0,5 мм в дерме площадью 0,15 мм<sup>2</sup>, в которых определяли экспрессию толл-подобных рецепторов измерением площади эпидермиса и сосудов дермы с положительной реакцией клеток в квадратных микрометрах (мкм<sup>2</sup>). Содержание толл-подобных рецепторов на стенках сосудов выражали в процентах по отношению к общей площади поля зрения.

Статистический анализ проводили с применением пакета прикладных программ STATISTICA 8. Проверка на нормальность распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро—Уилкса. Описательная статистика количественных признаков представлена в виде медиан, в скобках приведены границы интерквартильных отрезков (в формате Me [Q1÷Q3]). При сравнении показателей до и после лечения внутри группы (анализ признака в динамике) использовали тест Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при значении уровня достоверности ниже 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## Результаты и обсуждение

У больных псориазом в очагах поражения выявлено достоверное увеличение площади экспрессии TLR2 и TLR4 до 990,2 мкм<sup>2</sup> (817,7÷1099,2) и 968,5 мкм<sup>2</sup> (750,5÷1093,6) соответственно. В дерме площадь сосудов с положительной экспрессией TLR2 и TLR4 была повышена до 7,1% (5,3÷9,1) и 8,2% (5,7÷10,4) соответ-

ственно. Кроме того, экспрессия TLR2 и TLR4 обнаружена на клетках макрофагального и гистиоцитарного ряда воспалительных инфильтратов, на эпителиоцитах потовых желез и наружного корневого влагалища волосяных фолликулов.

В биоптатах кожи, полученных от здоровых лиц, площадь экспрессии TLR2 в эпидермисе составила 213,2 мкм<sup>2</sup> (191,3÷223,0), TLR 4 — 217,3 мкм<sup>2</sup> (191,5÷22,9). В дерме у здоровых лиц экспрессия TLR2 и TLR4 отмечалась на эндотелии кровеносных сосудов, клетках макрофагального и гистиоцитарного ряда, располагающихся вокруг сосудов сосочкового слоя дермы, на эпителиоцитах потовых желез и наружного корневого влагалища волосяных фолликулов. Площадь сосудов с положительной экспрессией TLR2 и TLR4 у здоровых лиц составила 2,5% (1,9÷3,3) и 2,3% (1,9÷2,4) соответственно.

Реакция с моноклональными антителами к TLR9 была отрицательной в эпидермисе и дерме как у больных псориазом, так и у здоровых лиц.

Таким образом, в результате проведенных нами исследований установлено статистически значимое повышение экспрессии рецепторов врожденного иммунитета — толл-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 в коже больных псориазом. У здоровых лиц TLR2 и TLR4 присутствуют в эпидермисе и дерме, формируя сеть, выполняющую роль фильтра, контролирующего проникновение генетически чужеродных патогенов в организм. Следовательно, и защитные функции кожи, находящейся в непрерывном взаимодействии с внешней средой, и развитие иммунного воспаления при псориазе осуществляются одними и теми же струк-

турами врожденного иммунитета — толл-подобными рецепторами 2 и 4-го типов. Разница между этими процессами заключается в количестве, различном распределении в компартментах кожи и степени активации структур.

Функции толл-подобных рецепторов в эмбриогенезе и в стерильных условиях неизвестны. Существуют гипотезы, позволяющие полагать, что увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 структурами кожи может быть связано с несколькими причинами: проникновением экзогенных патогенов, нарушением микробиоценоза кожи у больных, утратой толерантности к симбионтной флоре из-за изменения антигенной структуры комменсалов, из-за синтеза эндогенных лигандов, ассоциированных с повреждением тканей (в результате изменяется антигенная структура собственных клеток организма), возникновением мутаций, инактивирующих сами толл-подобные рецепторы, или сигнальные протеинкиназы, либо мутаций, приводящих рецепторы в постоянно активированное состояние. Возможно, исследование полиморфизма генов толл-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 у больных псориазом могло бы способствовать новому пониманию причин иммунных нарушений.

Результаты исследования по определению в коже больных количества толл-подобных рецепторов 2 и 4-го типов в перспективе могут быть использованы для научнообоснованной оптимизации существующих методов биологической терапии больных псориазом, так как толл-подобные рецепторы могут рассматриваться в качестве возможной молекулярной мишени при разработке биологических препаратов. ■

## Литература

1. Скрипкин Ю.К., Бутов Ю.С. Клиническая дерматовенерология. М: ГЭОТАР-Медиа 2009;II.
2. Хайтов Р.М., Игнатова Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология. М: Медицина. 2010;111—164.
3. Ярилин А.А. Иммунные процессы в коже. Косметика и медицина. 2006; 1: 30—41.
4. Janeway C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol— 2002; 20: 197—216.
5. Kopp E.B., Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. Curr Opin Immunol 1999; 11: 1: 13—28.
6. von Andrian U H., Mackay C.B. T-cell function and migration: two sides of the same coin. N Engl J Med 2000; 343: 1020—1034.
7. Takeuchi O., Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell 2010; 140: 805—820.